

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## *Desenvolvimento de um método inovador para o controlo de biofilmes*

### Tese de Mestrado

de

Anabela Carina Novais Ascensão

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientador na FEUP: Prof. Manuel Simões

Coorientador na FEUP: Prof. Luís Miguel Madeira



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

**FEUP**

Departamento de Engenharia Química

**março de 2014**

*“Tell me and I forget, teach me and I may remember, involve me and I learn.”*

Benjamin Franklin



## Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação e que merecem o meu reconhecimento.

Em primeiro lugar agradeço aos professores **Manuel Simões** e **Luís Miguel Madeira**, não só pela orientação que me deram ao longo deste semestre, mas também por me terem proporcionado um tema de dissertação que combinasse as duas áreas que mais gosto dentro da Engenharia: a Química e a Biotecnologia.

A todos os investigadores do laboratório E007, que de alguma forma me ajudaram. Em especial agradeço à **Inês Gomes**, que foi excepcional no tempo que me concedeu para tirar todas as minhas dúvidas e que se prontificou sempre a ajudar-me em tudo. Não posso deixar de mencionar a **Luciana**, a **Catarina**, a **Joana** e a **Rita**, pela paciência, ajuda e amizade que sempre mostraram para comigo.

À **Carla Ferreira**, que me deu todo o suporte inicial para “arrancar” com o trabalho, e que ao longo do semestre se mostrou sempre preocupada e atenta.

À **Paula** e à **Sílvia** do laboratório E-103, pelo carinho que sempre me deram, e por se mostrarem sempre disponíveis em ajudar.

Às minhas colegas de trabalho na **HUSSEL**, à **D. Adelaide**, à **Claudina**, à **Florisbela** e à **Raquel**, que sempre adaptaram o seu horário ao meu e me concederam sempre as trocas necessárias para que não me prejudicasse ao longo do meu percurso na faculdade.

Aos meus amigos **Ana Ferreira**, **Florisa Pereira** e **Pedro Carrapiço**, que me acompanharam nestes últimos anos de curso. Foram muitas vezes a minha motivação para nunca desistir e proporcionaram-me dos melhores momentos que já pude viver.

À minha família, **pais e irmãos**, que sempre se mostraram orgulhosos e compreensivos ao longo destes anos.

Ao **Hugo**, pelo amor e paciência, pois foi o meu pilar ao longo do meu percurso académico e deu-me toda a força e motivação.

**Um muito obrigada a todos!**



## Resumo

Os biofilmes são aglomerados de células que atuam como uma fonte de contaminação constante. A possibilidade dos biofilmes albergarem e libertarem células de microrganismos patogénicos torna a sua presença comprometedora para a qualidade microbiológica de matérias-primas e produtos finais da indústria. Adicionalmente, estas estruturas podem provocar problemas processuais, nomeadamente a corrosão nos equipamentos industriais, limitações à transferência de calor e queda de pressão.

A maior parte dos estudos do controlo de biofilmes baseia-se na utilização de agentes químicos que, devido à sua toxicidade, podem causar impactos negativos na saúde humana e no ambiente. Além disso, esta estratégia tem demonstrado fraca eficiência na remoção de biofilmes das superfícies dos equipamentos. Torna-se assim relevante estudar métodos alternativos que assegurem o controlo da formação de biofilmes nas indústrias.

Neste trabalho estudou-se a aplicação do processo Fenton, um processo avançado de oxidação, no controlo de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* como alternativa à utilização de biocidas à base de cloro, comumente utilizados na indústria.

A formação de biofilmes ocorreu num reator que operou em contínuo durante 7 dias. Estes foram criados em superfícies de policloreto de vinilo. Estes biofilmes foram expostos a diferentes concentrações (0,5 a 100 ppm) de hipoclorito de sódio, dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio (reagente de Fenton com concentração fixa de sal de ferro). O desempenho dos agentes antimicrobianos utilizados foi validado pela determinação de células viáveis e não-viáveis, usando o *kit* Live/Dead® *BacLight*™, e pela determinação das unidades formadoras de colónias em meio sólido.

Os agentes oxidantes utilizados no trabalho foram portanto os seguintes: o hipoclorito de sódio (NaOCl), o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) e o reagente de Fenton - mistura de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e catalisador de sal de ferro.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho percebeu-se que os agentes antimicrobianos convencionais, nomeadamente o dióxido de cloro, continuam a ser mais eficientes que o processo Fenton. No entanto, este processo apresenta-se promissor se utilizado como um pré-tratamento, uma vez que proporcionou a desagregação do biofilme da superfície de adesão com muita facilidade.

O valor da CIM tão elevado do reagente de Fenton aplicado a células em suspensão (> 3000 ppm) mostrou uma maior capacidade deste reagente atuar perante células agregadas em biofilme do que em células no estado plântónico.

**Palavras-chave:** Biofilmes, controlo de biofilmes, agentes antimicrobianos, reagente de Fenton



## Abstract

Biofilms are clusters of cells that act as a constant source of contamination. The possibility of biofilms harboring and releasing cells of pathogenic microorganisms makes its presence compromising to the microbiological quality of the raw materials and final products. Additionally, these structures may cause procedural problems such as corrosion in industrial equipment, restrictions on the heat transfer and pressure drop.

Most studies about the control of biofilms are based on the use of chemical agents that, due to their toxicity, may cause adverse effects on human health and on the environment. In addition, these studies have demonstrated poor efficiency in removing biofilm from the surfaces of equipment. Because of these drawbacks, it becomes important to study the characteristics of biofilms and techniques that control their formation and development.

In this work, the technique of Fenton, an advanced oxidation process in the control of biofilms of *Pseudomonas fluorescens*, was studied as an alternative to the use of chlorine-based biocides, commonly used in industry.

The formation of biofilms occurred in a reactor which operated periodically in continuous for 7 days. These were created on surfaces of polyvinyl chloride (PVC) coupons. These biofilms were exposed to various concentrations (0,5 to 100 ppm) of sodium hypochlorite, chlorine dioxide and hydrogen peroxide (Fenton's reagent with constant concentration of iron salt). The performance of the antimicrobial agents used was assessed by the quantification of viable and nonviable cells using Live/Dead® *BacLight*™ kit, and by colony formation units on solid media.

The oxidizing agents used in the study were: sodium hypochlorite (NaOCl), chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) and Fenton reagent - hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

According to the results obtained in this work, conventional antimicrobial agents, for example the chlorine dioxide, continue to be more efficient than the technique of Fenton. Nevertheless, this is very promising if used as a pretreatment, since it was able to easily separate the biofilm from the adhesive surface.

The high value of the Fenton reagent CIM applied to cells in suspension (> 3000 ppm) showed a greater capacity of this reagent to act upon cells aggregated in biofilm than in cells in the planktonic state.

**Keywords:** Biofilms, biofilm control, antimicrobial agents, Fenton's reaction



## **Declaração**

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

*Assinar e datar*



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Declaração .....	x
Índice .....	xii
Lista de figuras .....	xiv
Lista de Tabelas .....	xv
Notação e glossário .....	xvii
1 Introdução .....	1
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	1
1.2 Organização da Tese .....	1
2 Contexto e Estado da Arte .....	3
2.1 Os biofilmes na indústria.....	3
2.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	6
2.3 Controlo de biofilmes - limpeza e desinfeção.....	6
2.4 Novas estratégias para o controlo de biofilmes.....	8
2.4.1 Processos avançados de oxidação .....	9
3 Materiais e métodos .....	15
3.1 Microrganismo e condições da cultura .....	15
3.2 Preparação do inóculo.....	15
3.3 Superfície de adesão.....	16
3.4 Operação do reator .....	16
3.5 Esterilização do reator .....	18
3.6 Agentes antimicrobianos .....	19
3.7 Manipulação e análise do biofilme .....	19
3.7.1 Caracterização do biofilme .....	20

3.7.2	Avaliação da viabilidade por uma técnica de coloração.....	20
3.7.3	Avaliação da culturabilidade .....	21
3.8	Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas em células suspensas.....	21
3.9	Análise estatística .....	22
4	Resultados e discussão .....	23
4.1	Caracterização do biofilme .....	23
4.2	Determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas em células suspensas.....	24
4.3	Efeito do hipoclorito de sódio em biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
4.4	Efeito do dióxido de cloro em biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ..	26
4.5	Efeito do reagente de Fenton em biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
4.5.1	Efeito do pH .....	28
4.6	Comparação do efeito antimicrobiano dos biocidas à base de cloro (NaOCl e ClO <sub>2</sub> ) com o reagente de Fenton .....	29
5	Conclusões e perspectivas para trabalho futuro.....	34
5.1	Conclusões .....	34
5.2	Trabalho Futuro .....	34
	Bibliografia .....	36
	Anexos.....	42
	Anexo 1 Teste da catalase.....	42

## **Lista de figuras**

Figura 2.1 - Fases da formação de um biofilme. Baseado em Howard et al. (2001). ..	5
Figura 3.1 - Fotografia dos coupons utilizados durante o trabalho experimental. ....	16
Figura 3.2 - Fotografia do suporte metálico que sustentou os coupons. ....	17
Figura 3.3 - Fotografia da instalação. ....	18
Figura 4.1- Fotografia do microscópio de epifluorescência de células de biofilmes sem tratamento (Ampliação 1000x). ....	23
Figura 4.2 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração de NaOCl. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados. ....	25
Figura 4.3 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração de ClO <sub>2</sub> . As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados. ....	26
Figura 4.4 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração do reagente de Fenton. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados. ....	27
Figura 4.5 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função do pH. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de um ensaio com duplicados. ....	28
Figura 4.6 - Influência do pH na culturabilidade das células do biofilme: (a) pH 3, (b) pH 5 e (c) pH 7. ....	29
Figura 4.7 - Perda da viabilidade nas células de biofilmes de <i>Pseudomonas fluorescens</i> avaliada pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™. ....	30
Figura 4.8 - Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) em função da concentração de biocida. ....	31
Figura A.1 - Teste da catalase à bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> . ....	42



## **Lista de Tabelas**

Tabela 2-1 - Propriedades e funções das substâncias poliméricas extracelulares. Baseado em Smirnova et al. (2010).....	4
Tabela 2-2 - Principais desinfetantes utilizados em SDAP. Baseado em Simões e Simões, (2013). ....	8
Tabela 2-3 - Potenciais de redução a 25 °C de alguns compostos oxidantes. Baseado em Dias (2011). ....	9
Tabela 2-4 - Processos de oxidação química avançada. Baseado em Higarashi et al. (2000) .....	10
Tabela 2-5 - Fatores que condicionam a reação de Fenton. ....	12
Tabela 4-2 - Determinação das CIM e CBM para células de <i>P. fluorescens</i> em suspensão. ....	24
Tabela 4-3 - Fotografias do microscópio de epifluorescência de células de biofilmes após tratamento com os biocidas NaOCl, ClO <sub>2</sub> e reagente de Fenton, a diferentes concentrações (Ampliação 1000x). ....	32



## **Notação e glossário**

POA	Processos de oxidação avançados
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
L/D	Live/Dead
PCA	Plate count agar
PVC	Policloreto de vinilo
Rpm	Rotações por minuto
SDAP	Sistemas de distribuição de água potável
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
UFC	Unidades formadoras de colónias

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A aptidão que as bactérias têm para aderir a superfícies e formar biofilmes tem grandes implicações numa variedade de indústrias, onde os biofilmes geram uma fonte persistente de contaminação. A formação de biofilme é determinada não só pela natureza da superfície onde as células vão aderir, mas também pelas características da célula bacteriana e por fatores ambientais (Van Houdt e Michiels, 2010). Geralmente, a formação destas estruturas dá-se em superfícies molhadas, pelo que a sua presença em sistemas de distribuição de água potável (SDAP) se torna inevitável.

O microrganismo selecionado para este estudo foi a bactéria *Pseudomonas fluorescens*. Esta bactéria é ubíqua e é conhecida por ser uma boa produtora de biofilme. Além disso, esta bactéria tem um curto tempo de produção de biofilme e apresenta resistência a tratamentos térmicos e químicos (Dongan e Boor, 2003; Wiedmann *et al.*, 2000).

O facto das bactérias se estarem a tornar resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais mostra claramente a importância da obtenção de novas técnicas de combate aos biofilmes (Sidhu *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2010). O processo de Fenton é considerado como uma alternativa promissora para a desinfecção e inativação de biofilme em superfícies (Gosselin *et al.*, 2013).

O objetivo desta tese é estudar o efeito deste processo de oxidação avançada na viabilidade e culturabilidade de células de biofilmes de *P. fluorescens* e compará-lo com dois biocidas oxidantes, convencionais, à base de cloro (NaOCl e ClO<sub>2</sub>).

## 1.2 Organização da Tese

Este trabalho está dividido em cinco capítulos. O capítulo 1 faz uma pequena apresentação e descreve os objetivos do trabalho.

O capítulo 2 proporciona uma breve revisão da literatura, com os principais problemas associados à formação de biofilmes na indústria e a forma de combater o seu desenvolvimento. É também dada informação sobre algumas estratégias recentemente estudadas para o controlo de biofilmes.

O capítulo 3 descreve a metodologia utilizada para realizar o trabalho: formação dos biofilmes, o seu manuseamento e as análises efetuadas. No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

As principais conclusões do trabalho e sugestões para trabalhos futuros são resumidas no capítulo 5.

## 2 Contexto e Estado da Arte

### 2.1 Os biofilmes na indústria

Os biofilmes microbianos podem formar-se praticamente em qualquer material que esteja em contacto com a água (Stewart *et al.*, 1996) e uma vez formados, são mais difíceis de ser completamente removidos (Simões *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2005a).

As células aderidas ao biofilme têm vantagens no seu crescimento e sobrevivência em relação às células em suspensão. De acordo com James *et al.* (1995), esta vantagem deve-se à formação de uma matriz, produzida pelas próprias bactérias, que rodeia o biofilme. Esta matriz protege o biofilme contra o ataque de agentes desinfetantes, mantendo-o envolvido de nutrientes. Esta matriz é constituída predominantemente por água (até 95% em peso húmido) e por substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que providenciam estabilidade ao biofilme, atuando como um escudo protetor das agressões exteriores (Flemming *et al.*, 1994).

Na Tabela 2-1 estão indicadas algumas propriedades e funções destas substâncias.

Tabela 2-1 - Propriedades e funções das substâncias poliméricas extracelulares.  
Baseado em Smirnova *et al.* (2010).

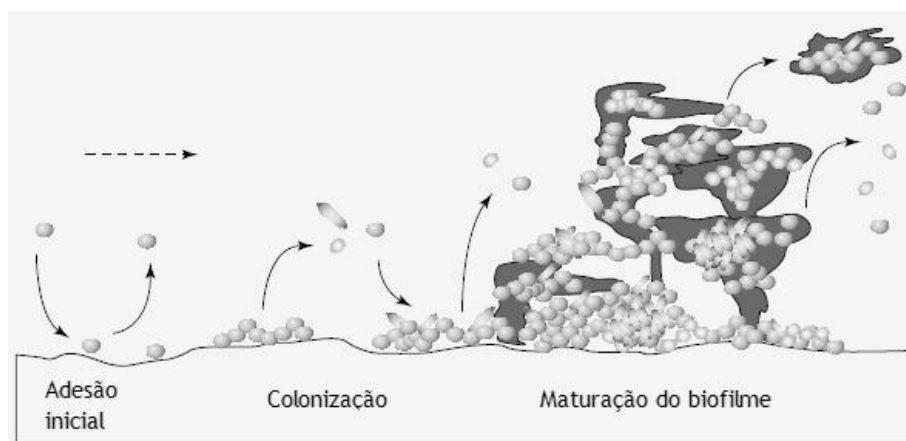
Função da matriz de SPE	Natureza das SPE	O papel no biofilme
<b>Estrutural</b>	Polissacarídeos neutros e ácidos	Componente estrutural
	Amilóides	
<b>Adsorativa</b>	Polissacarídeos hidrofóbicos ou com carga	Troca iónica, adsorção
<b>Ativante</b>	Enzimas extracelulares	Degradação de moléculas
<b>Superfície ativa</b>	Anfifílicos	Superfície ativa
	Vesículas de membrana	Exportação das células, adsorção
<b>Informativa</b>	Lectinas	Especificidade, reconhecimento
	Ácidos nucleicos	Informação genética, estrutura
<b>Nutritiva</b>	Vários polímeros	Fontes de C, N e P

A formação de biofilme é um processo muito complexo, que depende de muitas variáveis, nomeadamente fatores ambientais como a temperatura e pH, a velocidade do fluido, a concentração de nutrientes, a concentração de desinfetante e o estado de conservação dos materiais de adesão (Deines *et al.*, 2010; Donlan, 2002; Vieira *et al.*, 1993).

Os mecanismos envolvidos neste processo de formação de biofilmes (Figura 2.1) são:

- O transporte das bactérias até à superfície, que pode realizar-se por difusão ou convecção, ou ainda pelo transporte promovido pelas estruturas de locomoção celular, como no caso de microrganismos portadores de flagelos ou outras estruturas de mobilidade;
- A adesão das células à superfície, normalmente resultante de forças de interação entre ambas, como por exemplo forças de natureza hidrofóbica e eletrostática;

- c) A maturação do biofilme, momento em que as células crescem e se reproduzem. É durante esta fase que ocorre a formação da matriz de SPE, altamente hidratada, que confere ao biofilme estabilidade e resistência a agentes biocidas e antibióticos;
- d) O desprendimento das células no estado plantónico ou de aglomerados de células. Este mecanismo ocorre devido à erosão superficial, em que as camadas mais externas do biofilme libertam células. Estas, por sua vez, podem multiplicar-se e aderir sobre novas zonas da superfície iniciando a formação de um novo biofilme. Ocasionalmente, aglomerados de células podem desprender-se do biofilme originando danos numa grande quantidade do mesmo.



*Figura 2.1 - Fases da formação de um biofilme. Baseado em Howard et al. (2001).*

A formação destas comunidades sésseis e a sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão na raiz de muitas infeções bacterianas persistentes e crónicas (Costerton *et al.*, 1999).

No entanto, o aumento da resistência aos agentes biocidas por parte dos microrganismos, não se deve totalmente à falha desses agentes antimicrobianos (Costerton *et al.*, 1999). Em vez disso, esta resistência pode ser explicada pela hipótese de existir uma limitação de nutrientes, que faz com que as células dos biofilmes entrem num estado de crescimento lento (Cochran *et al.*, 2000). Células lentas ou sem crescimento mostram ser menos suscetíveis a agentes antimicrobianos comparativamente com células cultivadas num meio rico em nutrientes e com elevadas taxas de crescimento (Gilbert e Brown, 1995; Mah e O'Toole, 2001).



Outra hipótese para a redução da suscetibilidade do biofilme em relação a agentes antimicrobianos é que, pelo menos uma das células do biofilme pode adotar um fenótipo distinto, mantendo-a diferenciada e protegida (Cochran *et al.*, 2000).

Os agentes antimicrobianos têm sido as principais armas usadas para controlar os biofilmes indesejáveis, interferindo com o metabolismo microbiano ou induzindo o seu desprendimento natural da superfície de adesão. No entanto, muitos agentes antimicrobianos mostram-se ineficazes na prevenção e no controle de biofilmes, demonstrando a elevada resistência e resiliência das células em biofilmes (Simões *et al.*, 2010).

## 2.2 *Pseudomonas fluorescens*

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria Gram-negativa aeróbia, da família *Pseudomonadaceae*. Esta bactéria tem a forma de bastonete, é não formadora de esporos e facilmente encontrada na água e nos solos, sendo bastante versátil, no que diz respeito à sua fonte de nutrientes (Bailey e Ollis 1986). A sua temperatura de crescimento ótima está compreendida entre os 25 e os 30 °C, a pH neutro (Cousin, 1982; Swart *et al.*, 1990).

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* forma biofilme com muita facilidade em diferentes condições de crescimento (Araújo *et al.*, 2013).

## 2.3 Controle de biofilmes - limpeza e desinfecção

A limpeza e a desinfecção dos equipamentos são operações indispensáveis nas mais diversas indústrias, particularmente na indústria alimentar, e a eficiência com que estas são realizadas podem afetar a qualidade do produto final (Carpentier, 1993).

A limpeza é essencial na minimização dos contaminantes microbianos nas superfícies dos equipamentos e é um processo que pode remover pelo menos 90% dos microrganismos aderidos às paredes dos equipamentos. No entanto, o processo de limpeza não é capaz de matar os microrganismos, sendo por isso necessária a implementação da desinfecção (Gibson *et al.*, 1999). Esta fase, por sua vez, é definida pela utilização de desinfetantes que matam os microrganismos. O objetivo da desinfecção é, portanto, reduzir as células viáveis da população microbiana na

superfície e evitar o crescimento antes da nova utilização dos equipamentos (Gibson *et al.*, 1999; Wirtanen *et al.*, 2001).

A eficiência da desinfeção é influenciada pelo pH, temperatura, concentração de agente desinfetante, tempo de contacto e interferência de substâncias orgânicas (Holah, 1992 ; Mosteller e Bishop, 1993). Kennedy (2011) refere que entre os vários tratamentos com biocidas, a combinação de produtos químicos de limpeza e de desinfeção se mostra favorável no controlo de biofilmes.

A escolha dos desinfetantes é uma etapa fundamental desta operação uma vez que estes produtos devem seguir um conjunto de requisitos, nomeadamente serem eficientes, seguros e fáceis de utilizar, e poderem ser facilmente retirados das superfícies com a lavagem com água, sem deixar resíduos tóxicos que possam afetar a boa qualidade do produto final. Outro aspeto importante a considerar na escolha destes produtos é a tendência destes para formarem subprodutos da desinfeção prejudiciais à saúde (Simões e Simões, 2013).

Na Tabela 2-2 apresentam-se os principais desinfetantes que são utilizados em sistemas de distribuição de água potável.

Tabela 2-2 - Principais desinfetantes utilizados em SDAP. Baseado em Simões e Simões, (2013).

Desinfetante	Eficaz contra	Produção de subprodutos da desinfeção
Cloro	Bactérias	Trihalometanos
	Vírus	Ácidos haloacéticos
Cloraminas	Bactérias	Trihalometanos
		Ácidos haloacéticos
Dióxido de cloro	Bactérias	Clorito
	<i>Cryptosporidium</i>	Clorato
	<i>Giardia</i>	Ácidos haloacéticos
	Vírus	
Ozono	Bactérias	Ácidos haloacéticos
	<i>Cryptosporidium</i>	Aldeídos
	<i>Giardia</i>	Aldoácidos e cetoácidos
	Vírus	Subprodutos bromados
		Peróxido de hidrogénio
Radiação UV	Bactérias	
	Vírus	Não
	Protozoários	

## 2.4 Novas estratégias para o controlo de biofilmes

O controlo microbiano nas mais diversas indústrias tem como objetivos reduzir e eliminar microrganismos e a sua atividade, bem como prevenir e controlar a formação de depósitos biológicos no equipamento de processo (Machado, 2005).

Alguns estudos desenvolveram estratégias que permitiram minimizar o uso de agentes antimicrobianos, dado estes poderem formar produtos secundários nocivos à saúde humana e ao ambiente. Ferreira *et al.* (2010), apresentaram uma tecnologia que utiliza micropartículas que imobilizam e transportam agentes biocidas, minimizando

assim a sua libertação para o meio ambiente. Esta técnica é um passo importante para a redução dos riscos ambientais e de saúde associados ao uso intensivo de agentes de desinfecção e, ao mesmo tempo, contribui para a redução dos custos de limpeza e desinfecção em muitas indústrias.

No entanto, os microrganismos podem desenvolver resistência e sobreviver a procedimentos de controlo, anteriormente eficazes. Devido ao aumento da resistência dos biofilmes aos biocidas convencionais de desinfecção, é necessário não só procurar novas tecnologias que envolvam estes desinfetantes convencionais, mas também novos métodos que combatam a resistência microbiana.

#### 2.4.1 Processos avançados de oxidação

Existem numerosos compostos e microrganismos que são resistentes à ação dos agentes oxidantes convencionais como o oxigénio, ozono, cloro, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, permanganato de potássio e peróxido de hidrogénio, tornando-se necessário recorrer a processos de oxidação avançados (POA). Estes processos referem-se a um conjunto de procedimentos de tratamento químico destinados a remover compostos orgânicos e inorgânicos da água através de reações com radicais hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Glaze, Kang e Chapin 1987). O potencial de oxidação dos radicais hidroxilo é muito elevado comparativamente com outros agentes oxidantes (Tabela 2-3), pelo que são capazes de reagir praticamente com todas as classes de compostos orgânicos (Lu *et al.*, 1994).

*Tabela 2-3 - Potenciais de redução a 25 °C de alguns compostos oxidantes. Baseado em Dias (2011).*

Composto oxidante	Potencial de Redução (V)
Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )	2,73
Ozono ( $\text{O}_3$ )	2,08
Peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	1,78
Dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ )	1,57
Cloro ( $\text{Cl}_2$ )	1,36
Oxigénio ( $\text{O}_2$ )	1,23

Estes processos utilizam o ozono ( $O_3$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) ou a combinação de ambos como fonte dos radicais hidroxilo, entre outros, sendo assistidos ou não por radiação UV ou visível (Glaze *et al.*, 1987).

Os processos de oxidação química avançada encontram-se divididos em dois grupos: processos homogéneos e processos heterogéneos (Tabela 2-4).

*Tabela 2-4 - Processos de oxidação química avançada. Baseado em Higarashi et al. (2000)*

Sistema		POA
Homogéneos	Com irradiação	$O_3/UV$
		$H_2O_2/UV$
		$O_3/H_2O_2/UV$
		UV
	Sem irradiação	$O_3/H_2O_2$
		$O_3/OH^\cdot$
		$H_2O_2/Fe^{2+}$ (Fenton)
Heterogéneos	Com irradiação	Catalisador/UV
		Catalisador/ $H_2O_2/UV$
	Sem irradiação	Eletro-Fenton

Os processos homogéneos ocorrem numa única fase e utilizam geralmente ozono e/ou peróxido de hidrogénio para formar os radicais hidroxilo. Como se referiu esta geração de radicais pode ser assistida pelo uso de radiação, ou por um catalisador, normalmente um metal de transição como o ferro, sendo o processo designado de Fenton resultante do uso de  $H_2O_2/Fe^{2+}$  (Tabela 2-4).

Os processos heterogéneos utilizam semicondutores como catalisadores, por exemplo, o dióxido de titânio ou o óxido de zinco, ou catalisadores em que o ferro é suportado em matrizes como argilas, zeólitos ou carvões - processo Fenton heterogéneo (Higarashi *et al.*, 2000). A utilização de radiação UV e as propriedades semicondutoras do catalisador permitem a formação dos radicais hidroxilo e a consequente oxidação dos compostos orgânicos presentes no efluente. A fotocatalise heterogénea tem sido bastante estudada tanto com o catalisador em suspensão como suportado em reatores (Higarashi *et al.*, 2000).

#### 2.4.1.1 Reação de Fenton

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é um oxidante forte e tem uma vasta aplicação no tratamento de vários poluentes orgânicos e inorgânicos. No entanto, este composto não é eficaz perante concentrações elevadas de alguns contaminantes. Assim, ao serem adicionados sais de ferro ao  $H_2O_2$ , forma-se o denominado reagente de Fenton (Gallard e De Laat, 2001; Goldstein *et al.*, 1993) que origina oxidantes fortes ( $\cdot OH$ ) capazes de combater essa limitação (Neyens e Baeyens 2003).

A reação de Fenton é um tipo de POA definido como a geração catalítica de radicais hidroxilo ( $\cdot OH$ ) a partir da reação entre iões de ferro ( $Fe^{2+}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), em meio ácido, de acordo com a equação (1) (Andreozzi *et al.*, 1999; Neyens e Baeyens, 2003; Walling, 1975; Venny *et al.*, 2012).



Este processo tem demonstrado ser bastante eficiente na oxidação de compostos orgânicos tóxicos e não biodegradáveis (Flaherty e Huang, 1994).

O tratamento Fenton aparece como uma tecnologia de baixo custo e ambientalmente amigável, amplamente usado no tratamento de águas residuais provenientes de diversas indústrias, lamas de estações de tratamento de efluentes e na remediação de solos contaminados (Lin e Lo, 1997; Kang e Hwang, 2000).

Existem vários fatores que condicionam o desempenho do processo Fenton, sendo apresentados na Tabela 2-5 os mais relevantes, para uma dada concentração do poluente / efluente a tratar.

Tabela 2-5 - Fatores que condicionam a reação de Fenton.

Fator
pH
Temperatura
Concentração de peróxido de hidrogénio
Concentração de ferro

O pH é um fator determinante na eficiência da reação de Fenton. Vários estudos apresentaram um resultado semelhante quanto ao valor de pH que deve ser adotado (Gosselin *et al.*, 2013). O pH ótimo para esta reação encontra-se geralmente entre 2,5 e 4.

Valores acima de 4 fazem com que o ferro comece a precipitar na forma de hidróxido insolúvel diminuindo a quantidade de catalisador disponível para a produção dos radicais hidroxilo. Além disso, o peróxido de hidrogénio é pouco estável em meio alcalino. Por outro lado, para valores abaixo de 2,5, as altas concentrações de  $H^+$  podem captar radicais hidroxilo para formar água. O valor de pH é frequentemente controlado, para garantir que a reação ocorre nas condições ótimas, sendo esta a maior limitação do processo.

Outros fatores importantes na aplicação do processo Fenton são a concentração de ferro e de peróxido de hidrogénio na solução. A ausência de ferro não permite a formação de radicais hidroxilo. Aumentando a concentração de ferro, é possível obter-se maiores remoções em menores intervalos de tempo, pois a geração de radicais é acelerada. Porém, a partir de uma dada concentração, o aumento de ferro não implica uma maior remoção (Bigda, 1995). Da mesma forma, o aumento da concentração de peróxido de hidrogénio não é sempre favorável, existindo um ótimo consoante o poluente / efluente a tratar.

Este facto indica que pode existir uma quantidade ótima de catalisador e de peróxido de hidrogénio a utilizar, o que se deve à existência de reações indesejáveis entre o ferro e/ou  $H_2O_2$  (em excesso) e os radicais - efeito de *scavenging*. Alguns estudos indicam que existe uma razão mássica de  $Fe:H_2O_2$  de 1:5 (peso/peso) para a qual um acréscimo na concentração de ferro não provoca qualquer efeito, ou pode inclusivamente prejudicar a eficiência do processo.

A temperatura é outro dos fatores que limita este processo. Apesar da oxidação se tratar de uma reação exotérmica, verifica-se que a velocidade de reação aumenta com o aumento da temperatura (por questões cinéticas). No entanto, não é vantajoso tratar um efluente a temperaturas superiores a 40-50 °C, ocorrendo a decomposição do peróxido em oxigénio e água. Os estudos consultados referenciam temperaturas de operação entre 20 e 30 °C. Alguns desses estudos apontam temperaturas próximas de 30 °C para máxima remoção de CQO. Neste caso, a moderação da temperatura não diz respeito só a questões económicas como também de segurança.

Existem algumas limitações inerentes à utilização do reagente de Fenton. Neste processo poderá haver a formação de outros compostos tóxicos e que comprometam a aplicabilidade do tratamento. Convém não esquecer que se adiciona um alto teor de ferro à solução o que, só por si, não é muito vantajoso. As lamas formadas requerem tratamento apropriado, o que implica um aumento do custo de tratamento. Esta formação de lamas pode ocorrer no final do processo, quando se neutraliza a água que estava anteriormente a um pH ácido.

As principais indústrias químicas que utilizam o Fenton para o tratamento das suas águas residuais são (Bigda, 1995):

- Farmacêutica;
- Produção de tintas e corantes;
- Produção de inseticidas;
- Petroquímica;
- Explosivos;
- Plásticos.

### **Novas tecnologias do Fenton**

Têm sido estudadas algumas formas de combater as limitações do processo Fenton. Dois dos quais vieram diminuir estas limitações: o processo de Foto-Fenton e o processo Fenton com o ferro suportado.

#### **1. Foto-Fenton**

Venkatadri e Peters (1993), revelaram que o tratamento convencional de Fenton é mais vantajoso, em termos de custos de operação e manutenção, do que os tratamentos envolvendo UV. Contudo, a formação de lamas férricas revela-se um grande inconveniente deste processo. Para minimizar a formação de lamas estudou-



se a aplicação de radiação ultravioleta como adjuvante na formação de radicais hidroxilo. Assim, a mesma concentração de radicais é obtida utilizando uma menor concentração de íão ferroso. Este processo é conhecido por Foto-Fenton.

## 2. Ferro Suportado

A utilização de íões de ferro suportados numa matriz porosa de zeólito, argila, carvão ativado ou outro material surge como uma alternativa à utilização de ferro em solução. Deste modo evita-se o problema de formação de lamas. Apesar de haver alguma remoção do ferro suportado durante o processo de oxidação, a quantidade é geralmente relativamente baixa e não interfere com tratamentos biológicos posteriores. No entanto, essa lixiviação do ferro pode levar à desativação do catalisador.

## 3 Materiais e métodos

### 3.1 Microrganismo e condições da cultura

A bactéria utilizada ao longo deste trabalho para a produção de biofilme foi *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525<sup>T</sup>. Este microrganismo permite a rápida obtenção de biofilme e é também um dos mais frequentes na indústria (Simões, Pereira e Vieira 2005a). As condições ótimas de crescimento para esta bactéria são de  $27 \pm 3$  °C, pH 7, e glicose como a principal fonte de carbono.

A estirpe de *P. fluorescens* estava criopreservada em criotubos numa câmara a  $-80 \pm 2$  °C, numa mistura de nutrientes e glicerol a 15% (v/v).

A reativação da bactéria foi obtida retirando o criotubo da câmara, aquecendo-o com as mãos e, com a ajuda de uma ansa, retirado um pouco de suspensão bacteriana para uma placa de Petri com meio de cultura plate count agar (PCA, Merck). Após o espalhamento uniforme na placa, esta foi incubada a 30 °C durante 24 horas.

As células bacterianas cresceram num meio de cultura nutricional concentrado e estéril (autoclavado a 121 °C durante 20 minutos) consistindo em 5 g/L de glucose (Merck), 2,5 g/L de peptona (Liofilchem), 1,25 g/L de extrato de levedura (Merck) e tampão fosfato 0,2M a pH 7 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - Merck).

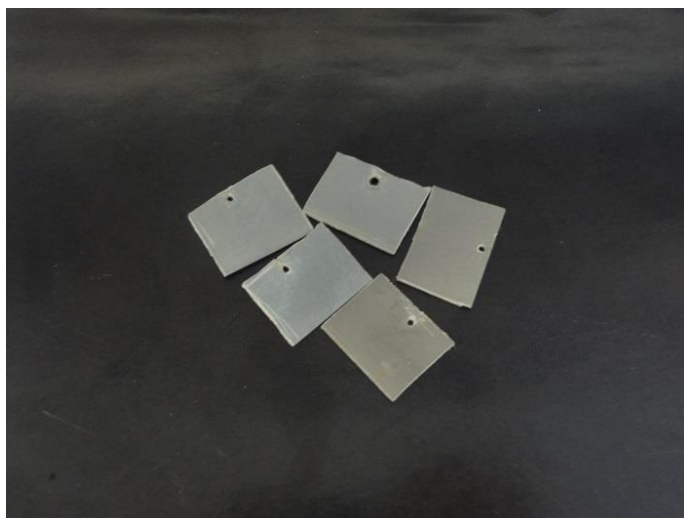
### 3.2 Preparação do inóculo

A suspensão bacteriana foi preparada transferindo, com auxílio de uma ansa estéril, uma porção de bactéria do meio sólido para um matraz de vidro contendo 500 ml de meio nutricional estéril (ver secção 3.1).

Esta suspensão bacteriana cresceu durante a noite numa incubadora (New Brunswick Scientific, I26, USA) à temperatura de 30 °C e a uma agitação de 120 rotações por minuto (rpm) com o objetivo de se obterem bactérias na fase exponencial de crescimento.

### **3.3 Superfície de adesão**

O material utilizado neste trabalho para a adesão das células foi o PVC. Foram utilizados 12 coupons deste material com 2 cm de largura, 1,5 cm de altura e 1 mm de espessura. Antes de serem suspensos no reator, todos os coupons foram inicialmente lavados com lixívia comercial diluída em água durante 10 minutos e posteriormente lavados com água destilada durante 10 minutos para retirar eventuais vestígios de lixívia.



*Figura 3.1 - Fotografia dos coupons utilizados durante o trabalho experimental.*

### **3.4 Operação do reator**

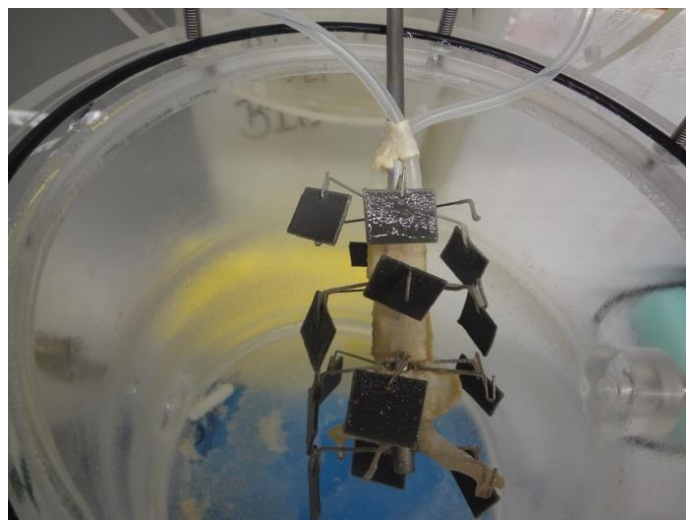
O biofilme foi formado num biorreator perfeitamente agitado, de polimetilmetacrilato (Perspex) e com um volume útil de 4 L. Este biorreator foi arejado, através de uma bomba de ar (modelo Elite 802) cujo caudal de ar é de 1l/min. O ar é esterilizado antes da entrada no reator por filtros de membrana de acetato de celulose (Merck). O biorreator foi submetido a agitação magnética constante por um agitador (Velp Scientifica, modelo F20320164). Na tampa do reator foi introduzido um suporte metálico, com ramificações em arame ao longo do mesmo, para suspender e distribuir os coupons de PVC de uma forma uniforme no reator (ver Figura 3.2).

Juntou-se a suspensão bacteriana que cresceu durante a noite (ver 3.2) a 3,5 L de solução salina (0,9% NaCl, p/p) previamente esterilizada e adicionada ao reator, permanecendo esta mistura em contacto durante 3 horas, antes da alimentação do

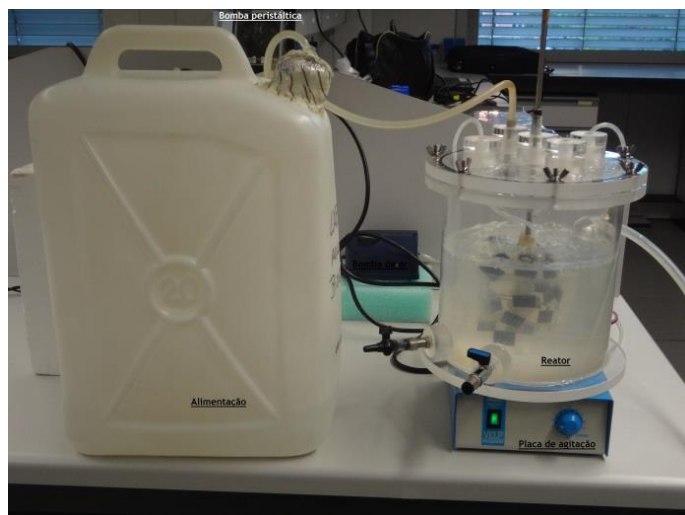
biorreator com meio fresco. Após as 3 horas iniciou-se o processo e o reator foi alimentado continuamente com uma solução nutritiva diluída, previamente esterilizada, constituída por 55 mg/l de glucose, 25 mg/l de peptona, 13 mg/l de extrato de levedura e tampão fosfato 0,2 M a pH 7 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), a um caudal de 0,4 l/h assegurado por uma bomba peristáltica (modelo RS330-828 de 12V) com fonte de alimentação (modelo RS472-3123 de 50 Hz).

A taxa de diluição de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  era superior à taxa específica de crescimento das células planctónicas, criando condições hidrodinâmicas adequadas para a formação de biofilme (Simões, 2003). Na Figura 3.3 pode visualizar-se a instalação completa: reator com a placa de agitação, alimentação, bomba peristáltica e bomba de ar.

O reator operou ao longo de 7 dias e depois foi submetido a desinfecção para nova utilização. Primeiro foi lavado abundantemente com água para retirar biofilme alojado nas paredes do reator. Seguidamente o reator foi preenchido com lixívia comercial diluída em água e deixou-se esta mistura atuar por 2 horas. Por fim, encheu-se o reator e esvaziou-se por 3 vezes, com água destilada estéril.



*Figura 3.2 - Fotografia do suporte metálico que sustentou os coupons.*



*Figura 3.3 - Fotografia da instalação.*

### **3.5 Esterilização do reator**

Após uma semana de operação, esvaziou-se o reator e retiraram-se cuidadosamente os coupons do suporte. Com uma chama acesa, garantiu-se a esterilidade até iniciar os ensaios com os biofilme formados.

Inicialmente, o reator bem como o suporte metálico e os coupons, foram passados por água retirando-se os restos de biofilme visível nas superfícies. A esterilização destes elementos foi certificada lavando muito bem com água e lixívia comercial. Após esta primeira lavagem, procedeu-se novamente à montagem do reator, com uma barra magnética no seu interior e encheu-se completamente o reator com água destilada estéril. Após algum tempo esvaziou-se o reator e repetiu-se este passo para garantir que a lixívia comercial foi completamente removida e que o reator se encontra devidamente lavado.

Após este processo, introduziu-se no reator 3,5 l de solução salina estéril, aos quais se juntou 500 ml de suspensão bacteriana na fase exponencial de crescimento, mantendo-se em contacto por 3 h. No final deste passo, o reator encontrava-se pronto para operar em contínuo.

### 3.6 Agentes antimicrobianos

Ao longo deste trabalho foram testados dois biocidas oxidantes: hipoclorito de sódio (NaOCl) e o dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). O processo Fenton foi o POA testado para comparar com os agentes antimicrobianos acima mencionados. O reagente de Fenton foi constituído por peróxido e hidrogénio e o sal de ferro utilizado foi o sulfato de ferro heptahidratado.

As concentrações testadas para cada biocida foram iguais (0,5 a 100 ppm), para uma melhor comparação entre eles, e foram preparadas em salina estéril. No ensaio com reagente de Fenton, as concentrações foram preparadas em água destilada estéril a pH 3.

A escolha desta gama de concentrações foi feita na medida em que são utilizadas na indústria. A menor concentração (0,5 ppm) diz respeito à máxima concentração de cloro residual que a água pode conter após 30 minutos de tempo de contacto com esta (Salvato *et al.*, 2009). A maior concentração testada (100 ppm) é a concentração máxima aplicada no tanque de desinfeção da Vitacress.

No reagente de Fenton, a concentração que variou foi respeitante ao peróxido de hidrogénio. A concentração de sal de ferro foi mantida constante com um valor de 10<sup>-2</sup> M uma vez que foi a sugerida por Gosselin *et al.* (2013) como a mais eficaz no controlo de biofilmes. Assim, sempre que é mencionada ao longo deste trabalho a variação da concentração de reagente de Fenton, na verdade a concentração que varia é a de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O hipoclorito de sódio a 10% (p/p) (NaOCl) foi obtido a partir de Sigma-Aldrich (Suíça) e o dióxido de cloro a 2 g/l foi obtido a partir de Loehrke (Deutschland). O peróxido de hidrogénio a 30% (p/v) e o sulfato de ferro penta-hidratado foram obtidos da Merck (Alemanha).

### 3.7 Manipulação e análise do biofilme

Após 7 dias de crescimento, os coupons com biofilmes foram retirados cuidadosamente do reator, e colocados em gobelés de vidro cobertos com folha de alumínio, previamente esterilizados, contendo 150 ml de solução de biocida. Este processo foi realizado à chama, para evitar contaminações.

As soluções de biocida foram feitas com tampão fosfato salino estéril. No entanto, uma vez que foi necessário baixar o pH das soluções no ensaio com reagente

de Fenton (pH 3), estas foram preparadas com água destilada estéril a pH 3. O pH da água destilada foi alterado com recurso a uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M) previamente preparada.

Os gobelés foram colocados numa placa de agitação magnética multiposições e procedeu-se ao tratamento com biocida durante uma hora. Ao fim de 1 hora de tratamento, o biocida residual foi exposto a um processo de neutralização, através da submersão sucessiva numa solução adequada, de modo a extinguir a atividade antimicrobiana. Quando o tratamento foi realizado com os agentes antimicrobianos à base de cloro ( $\text{NaOCl}$  e  $\text{ClO}_2$ ), os coupons foram lavados três vezes em tampão fosfato salino ( $\text{NaCl}$  a 0,85%, p/p). No caso em que foi utilizado o reagente de Fenton, os coupons com biofilme foram lavados três vezes em água com sulfito de sódio (0,13 g/l) para que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  restante fosse consumido instantaneamente (Gosselin *et al.*, 2013).

Após estas lavagens, os biofilmes foram ressuspensos em 20 ml do tampão fosfato salino. As soluções para neutralização e ressuspensão dos biofilmes foram preparadas e autoclavadas antes da utilização.

Foram realizados dois ensaios independentes com duplicados, para cada biocida.

### **3.7.1 Caracterização do biofilme**

O biofilme formado durante 7 dias foi caracterizado. Dois coupons com biofilmes foram introduzidos num frasco com 150 ml de solução salina (sem a presença de agentes biocida) e submetido ao tratamento de uma hora. Todo o procedimento foi realizado da mesma forma: efetuaram-se 3 lavagens dos biofilmes e os mesmos foram ressuspensos em 20 ml de tampão fosfato salino.

Além de terem sido avaliadas a viabilidade e culturabilidade, também foi determinada a massa seca do biofilme. Esta determinação foi realizada pela determinação dos sólidos voláteis totais (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2014).

### **3.7.2 Avaliação da viabilidade por uma técnica de coloração**

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen) e a visualização foi feita utilizando o microscópio

de epifluorescência Leica DM LB2 (Leica Microsystems, Alemanha). Este é um método rápido que permite contabilizar células de bactérias viáveis e não viáveis. O *kit* é composto por dois ácidos nucleicos de ligação que vão corar as células: Syto 9 e iodeto de propídio. O primeiro (componente A) penetra todas as membranas bacterianas e cora as células de verde fluorescente e o segundo (componente B) penetra apenas as células com as membranas danificadas, concedendo às células uma coloração de vermelho fluorescente.

Depois do tratamento com biocida e após neutralização e ressuspensão do biofilme, foi feita uma diluição 1:10 a todas as suspensões de biofilme. Foram transferidos 300 µl destas suspensões e filtrados por uma membrana de polycarbonato preto (0,2 µm de diâmetro de poro, Nucleopore). De seguida, foram adicionados 250 µl do componente A e 250 µl do componente B e deixou-se no escuro. Ao fim de 10 minutos, tornou a filtrar-se e visualizou-se a membrana no microscópio de epifluorescência com a objetiva 100× (imersão em óleo).

O número de células foi estimado pela contagem de um mínimo de 20 campos microscópicos, para cada análise.

### **3.7.3 Avaliação da culturabilidade**

O meio de cultura utilizado para avaliar a culturabilidade das células foi o PCA. Após a neutralização e ressuspensão do biofilme, foram realizadas várias diluições em solução salina (até diluição  $10^{-6}$ ). Depois de passarem pelo vórtex, foram transferidos 30 µl da suspensão de biofilme para a placa de PCA utilizando-se o método da gota. Este método foi utilizado devido à rapidez com que é efetuado e consistiu em dividir a placa em três zonas e colocar 1 gota (10 µl) em cada uma. As gotas, colocadas na parte superior da placa, foram forçadas a escorrer pela placa ao ser inclinada. A contagem das colónias foi realizada após 24 h de incubação a 30 °C.

## **3.8 Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas em células suspensas**

Estes testes foram realizados para perceber quais dos agentes biocidas conseguia ser mais eficaz na inibição do crescimento e morte de células plantónicas de *P. fluorescens*.



A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo após a incubação durante a noite (Andrews 2001). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos testados foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com McBain *et al.* (2004).

O teste foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços (Orange Scientific), com o inóculo preparado segundo a secção 3.2, depois de ajustar a densidade ótica para 0,1 (610 nm) ao juntar meio de cultura concentrado estéril (ver em 3.1).

Foram utilizadas três placas diferentes, cada uma correspondente a um agente antimicrobiano. As placas, por sua vez, foram divididas em colunas e cada coluna correspondeu ao teste de uma concentração específica de biocida. Foram preparadas várias soluções dos biocidas em estudo e adicionado um volume de 20 µL de cada solução a cada poço, que continha previamente 180 µL de culturas de células. A densidade ótica foi medida num leitor de microplacas a 610 nm (SpectraMax M2E, Molecular Devices) antes e depois de 24 h de incubação à temperatura ambiente ( $23 \pm 3$  °C) e 120 rpm.

A concentração bactericida mínima (CBM) corresponde à menor concentração de agente antimicrobiano que impede o crescimento de um organismo, depois de este ser aplicado sobre um meio de cultura livre de biocida (Andrews, 2001).

Após determinação da CIM, foi escolhida uma gama de concentrações onde esta estava inserida. Seguidamente foi pipetado um volume de 10 µl dos poços correspondentes a essa gama de concentrações para placas com meio de cultura PCA, que foram incubadas por 24 h a 30 °C. A CBM foi determinada como a menor concentração de biocida em que não apareceram colónias bacterianas nas placas.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados foram analisados pela ANOVA do *software* estatístico SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*), assumindo um nível de confiança igual ou superior a 95%.

## 4 Resultados e discussão

A influência da concentração dos agentes antimicrobianos testados na viabilidade e culturabilidade de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* foi avaliada por dois métodos diferentes, o kit de viabilidade BacLight e a culturabilidade em PCA, respetivamente.

### 4.1 Caracterização do biofilme

*Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria Gram negativa, aeróbia, catalase positiva (ver Figura A.1) e tem forma de bastonetes direitos ou ligeiramente curvos, usualmente encontradas nas mais diversas indústrias. Esta bactéria é uma boa produtora de biofilme e tem desenvolvido resistência a biocidas comumente utilizados, sendo necessário a constante procura de alternativas a estes desinfetantes (Araújo *et al.*, 2013; Cousin, 1982; Swart *et al.*, 1990).

Foi determinada a massa seca do biofilme desta bactéria, chegando-se a um resultado de  $5,722 \pm 0,205 \text{ g}_{\text{biofilme}}/\text{cm}^2$  num biofilme com  $6,28 \times 10^7$  células viáveis e  $6,33 \times 10^7$  células cultiváveis.

Na Figura 4.1 pode visualizar-se a fotografia do microscópio de epifluorescência para as células de biofilme que não sofreram tratamento com biocidas, coradas com o kit L/D BacLight.

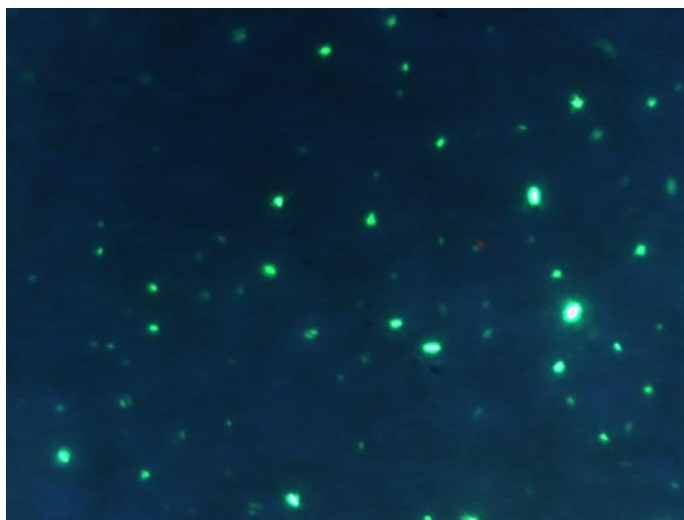


Figura 4.1- Fotografia do microscópio de epifluorescência de células de biofilmes sem tratamento (Ampliação 1000x).

Da análise visual pode constatar-se que quando não houve tratamento, as células do biofilme apresentaram-se como células viáveis. Verificou-se que apenas uma pequena percentagem ( $< 1\%$ ) das células estavam não-viáveis. A causa mais provável para este resultado poderá estar relacionada com as limitações do método que gera falsos negativos.

## 4.2 Determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas em células suspensas

De forma a avaliar a resistência da bactéria *P. fluorescens* aos biocidas estudados, foi também realizado um ensaio em suspensão para determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima que estes biocidas apresentam perante células no estado plantónico. Assim, determinaram-se os valores de CIM e CBM (Tabela 4-1).

*Tabela 4-1 - Determinação das CIM e CBM para células de P. fluorescens em suspensão.*

	CIM (mg/L)	CBM (mg/L)
NaOCl	450	500
ClO <sub>2</sub>	85	85
Reagente de Fenton	>3000	Não determinada (>3000)

Estes resultados indicam que o ClO<sub>2</sub> é o biocida mais eficaz, apresentando os menores valores de CIM e CBM. O biocida menos eficaz na morte de células plantónicas é o reagente de Fenton. Tanto os valores da CIM como da CBM foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com as de outro biocida.

No entanto, para o mesmo biocida, não houve uma diferença significativa entre os valores da CIM e CBM ( $P > 0,05$ ).

Não existem dados bibliográficos que permitam discutir valores da CIM e CBM do reagente de Fenton contra células plantónicas uma vez que este ensaio foi realizado pela primeira vez.

### 4.3 Efeito do hipoclorito de sódio em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*

O NaOCl é um desinfetante capaz de inibir a atividade metabólica de bactérias (Denyer e Stewart 1998). No entanto, a sua eficácia é afetada na presença de biofilmes que, segundo Tachikawa *et al.* (2005), está ligada ao facto de ocorrer reação com as SPE.

A Figura 4.2 representa o número de células viáveis no biofilme por área de coupon em função da concentração de NaOCl, ClO<sub>2</sub> e reagente de Fenton, respetivamente).

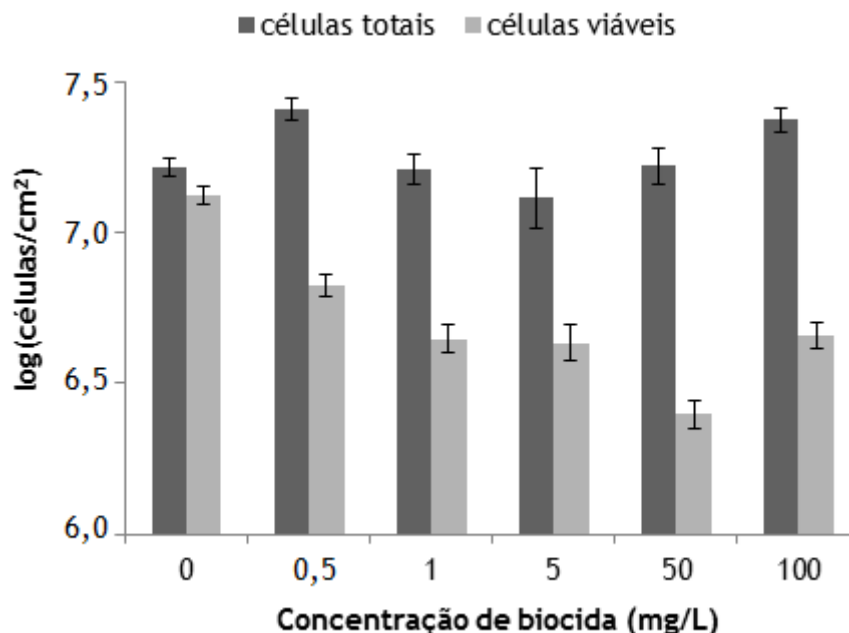


Figura 4.2 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração de NaOCl. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados.

A taxa de sobrevivência das células dos biofilmes vai diminuindo à medida que a concentração de NaOCl aumenta (Figura 4.2). No entanto, não houve uma redução significativa ( $P > 0,05$ ) quando se passou de 50 mg/L para 100 mg/L de biocida. Este facto pode ser explicado pela resistência que esta bactéria apresenta perante este biocida.

Apesar desta diminuição na taxa de sobrevivência, é evidente que este biocida oxidante não é eficaz na gama de concentrações testada, pois para a concentração mais elevada (100 mg/L), apenas morreram cerca de 10% das células totais.

#### 4.4 Efeito do dióxido de cloro em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*

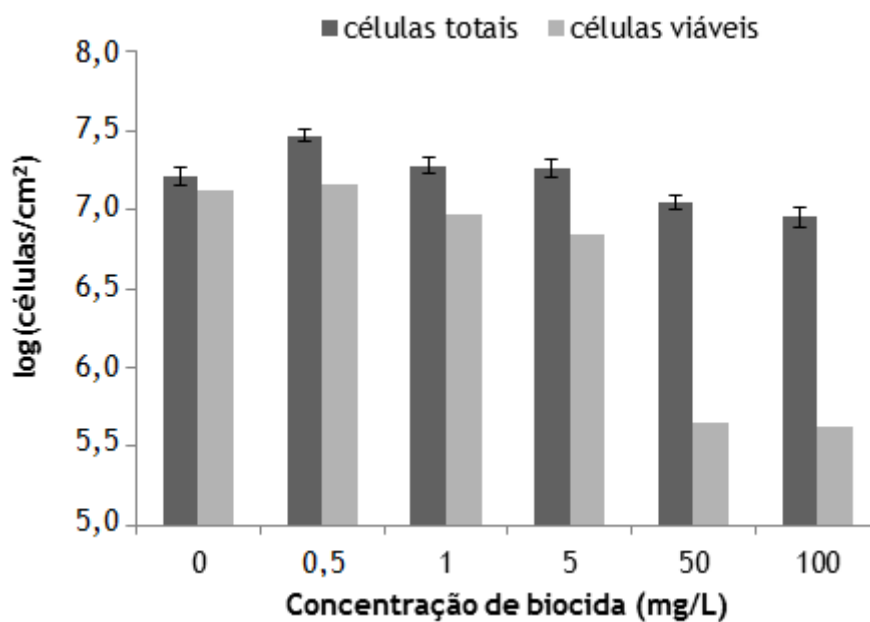


Figura 4.3 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração de  $\text{ClO}_2$ . As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados.

Da mesma forma que acontece no tratamento com NaOCl, também o aumento da concentração de  $\text{ClO}_2$  permite uma diminuição na taxa de sobrevivência das células no biofilme (Figura 4.3). Este biocida tornou-se mais eficaz a partir da concentração de 50 mg/L. Para concentrações menores (entre 0,5 mg/L e 5 mg/L) não houve uma diferença significativa na morte das células ( $P > 0,05$ ).

O tratamento com concentração mais elevada de  $\text{ClO}_2$  não foi capaz de provocar a morte total das células do biofilme, sendo que apenas houve uma diminuição de 1,3 log(células/cm²).

Em comparação com o NaOCl, o  $\text{ClO}_2$  mostrou-se menos eficaz para concentrações baixas (0,5 mg/L e 1 mg/L) mas mais eficiente para concentrações mais elevadas (entre 5 mg/L e 100 mg/L).

#### 4.5 Efeito do reagente de Fenton em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*

Um efeito bastante notório após a aplicação do reagente de Fenton, foi o facto do biofilme se desagregar com muita facilidade do coupon quando inserido nos gobelés com as soluções de diferentes concentrações de biocida. Este resultado pode estar relacionado com uma possível reação entre o biocida e as SPE.

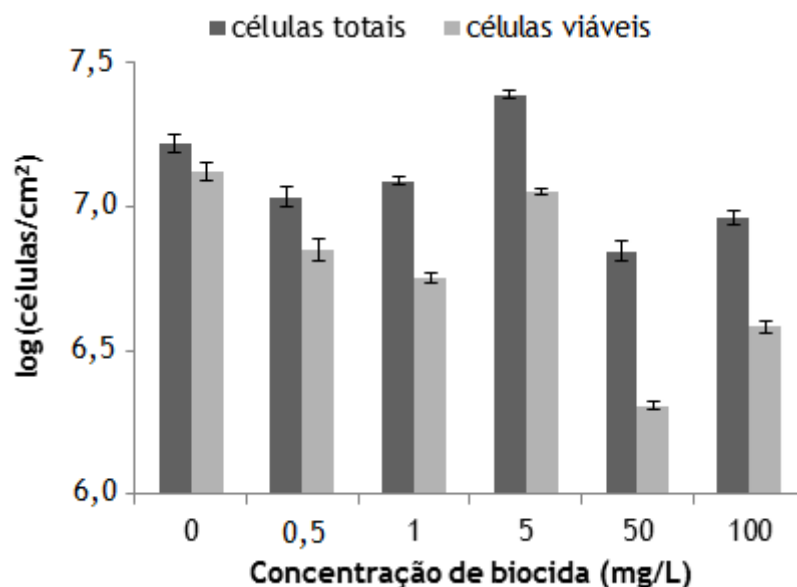


Figura 4.4 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função da concentração do reagente de Fenton. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de 2 ensaios independentes com duplicados.

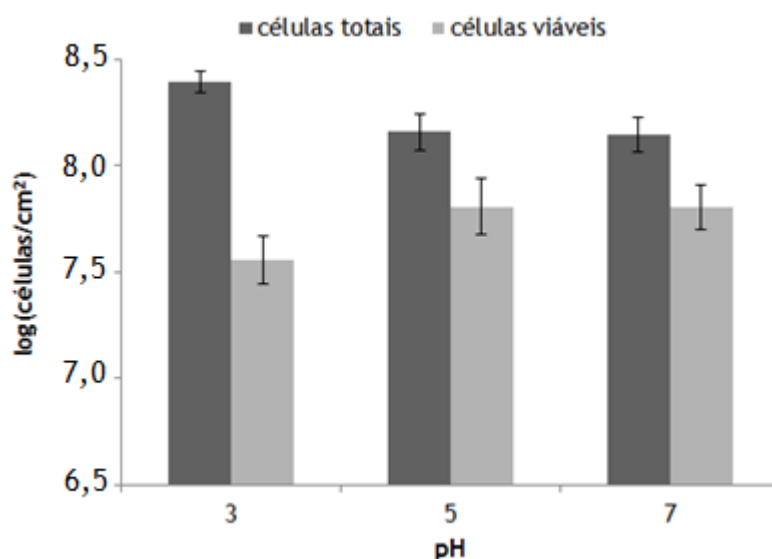
Como esperado, uma vez mais o aumento da concentração do reagente de Fenton proporcionou uma diminuição na taxa de sobrevivência das células no biofilme (Figura 4.4). No entanto, esta diminuição não foi acentuada, pelo que não houve uma diferença muito significativa ( $P > 0,05$ ).

É de notar que o facto de se perder eficácia quando se passa de 50 mg/l para 100 mg/l pode ser explicado por se ter encontrado a concentração ótima de conversão do  $H_2O_2$ .

#### 4.5.1 Efeito do pH

Uma vez que uma das limitações da utilização do processo Fenton é o facto de se ter de utilizar um pH entre 3 e 4, foi realizado o estudo da influência que o pH tem na viabilidade e culturabilidade celular. Assim, foi realizado um ensaio em que se colocaram biofilmes em três gobelés com água destilada estéril com pH diferentes. Foram testados 3 valores de pH: 3, 5 e 7.

As figuras 4.5 e 4.6 mostram a influência que o pH teve na viabilidade e culturabilidade celular, respetivamente.



*Figura 4.5 - Número de células viáveis e totais obtidas pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™, em função do pH. As barras de erro são respeitantes ao desvio padrão de um ensaio com duplicados.*

Analisando a Figura 4.5 verifica-se que a viabilidade celular não é afetada quando se comparam os valores de pH 5 e 7. De facto, verificou-se que não há uma diferença significativa entre os dois valores ( $P > 0,05$ ). No entanto, quando os biofilmes são expostos a pH 3, verifica-se que a viabilidade das células do biofilme é afetada significativamente ( $P < 0,05$ ) quando comparada com os resultados para os pH 5 e 7.

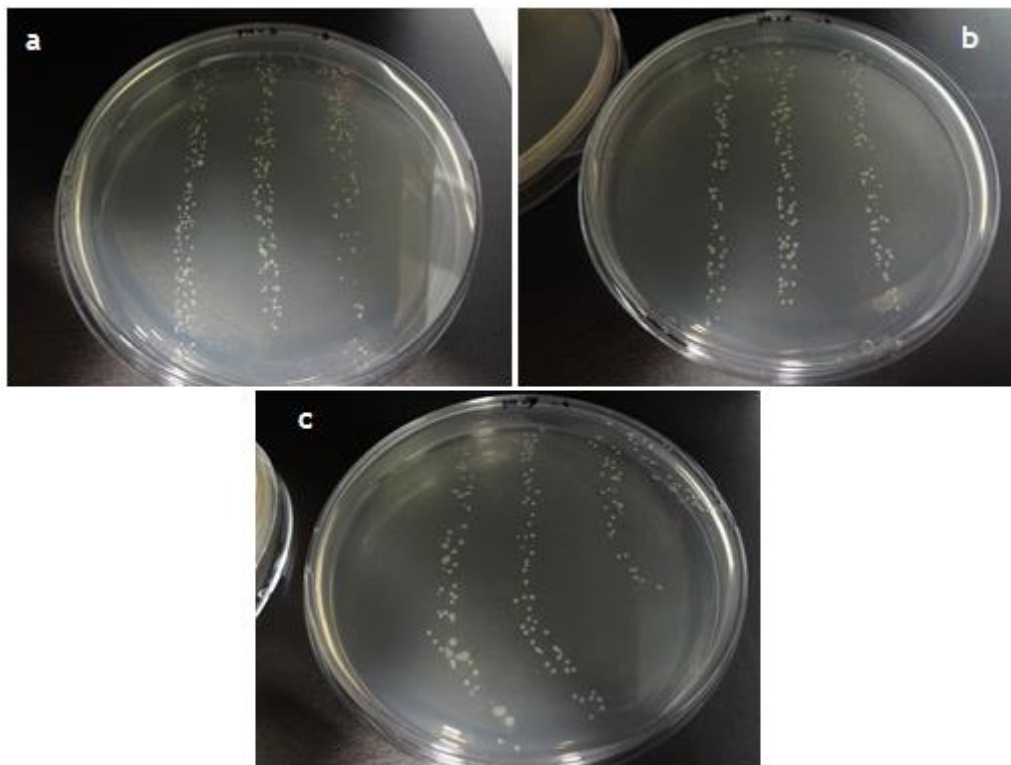


Figura 4.6 - Influência do pH na culturabilidade das células do biofilme: (a) pH 3, (b) pH 5 e (c) pH 7.

Após a visualização da Figura 4.6 verifica-se que mesmo tendo pouca influência, o facto de se baixar o pH leva à necessidade de contabilizar colónias na diluição  $10^{-3}$ , o que indica que o pH influencia a culturabilidade celular.

#### 4.6 Comparação do efeito antimicrobiano dos biocidas à base de cloro ( $\text{NaOCl}$ e $\text{ClO}_2$ ) com o reagente de Fenton

Os agentes oxidantes são comumente utilizados como desinfetantes (Kim *et al.*, 2002).

Ainda que os subprodutos gerados suscitem alguma preocupação, a desinfecção por cloro tem adquirido uma maior aceitação a nível comercial devido a algumas vantagens que apresenta em comparação com outros desinfetantes, como a sua simplicidade na utilização e custos moderados (Hassen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).



As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam a perda da viabilidade nas células em biofilmes e a contagem de colónias bacterianas totais (UFC) em função da concentração dos biocidas em estudo, respetivamente.

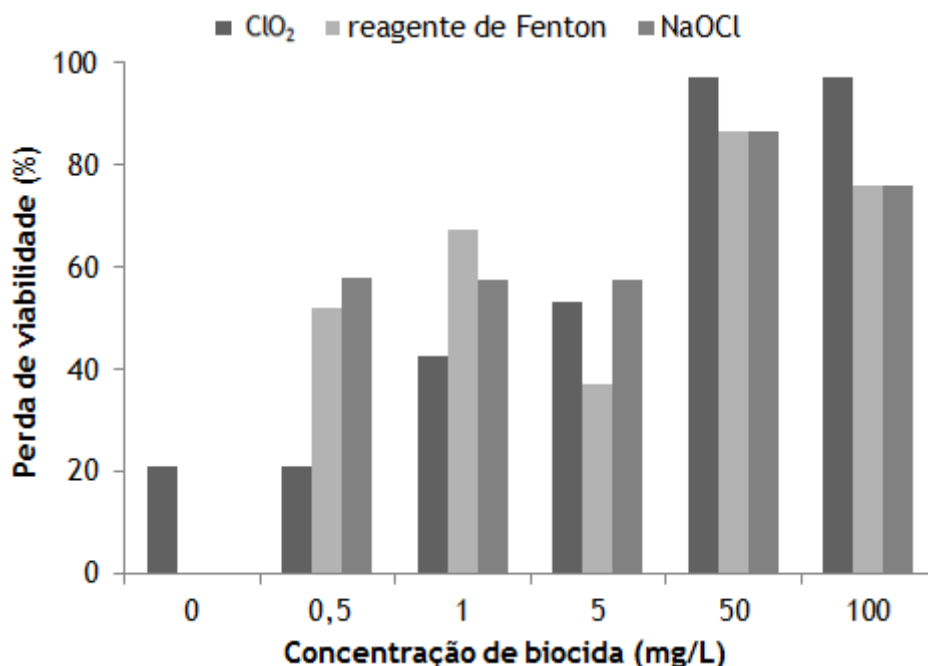


Figura 4.7 - Perda da viabilidade nas células de biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* avaliada pelo kit de viabilidade Live/Dead® BacLight™.

A Figura 4.7 mostra que a perda de viabilidade aumenta com o aumento da concentração do ClO<sub>2</sub>. Este biocida conseguiu gerar uma perda de viabilidade de 97,4% quando aplicada uma concentração de 100 mg/l de biocida, enquanto que para os outros biocidas (NaOCl e reagente de Fenton), o máximo de perda na viabilidade bacteriana (85,6% para os dois casos) aconteceu quando foi aplicada uma concentração de 50 mg/l. A perda de eficácia do reagente de Fenton, quando aplicada a concentração de 100 mg/l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ser explicada pelo efeito de *scavenging*.

De facto, existem estudos que mostram que o ClO<sub>2</sub> é mais eficaz como agente antimicrobiano em comparação com o NaOCl (Thorn *et al.*, 2013).

No tratamento em que se testou a concentração mais alta dos agentes antimicrobianos, apenas o ClO<sub>2</sub> permitiu um aumento na perda de viabilidade, ainda que não significativa ( $P > 0,05$ ), ao contrário dos outros biocidas testados, em que a perda de viabilidade foi menor do que com uma concentração mais baixa (50 mg/l).

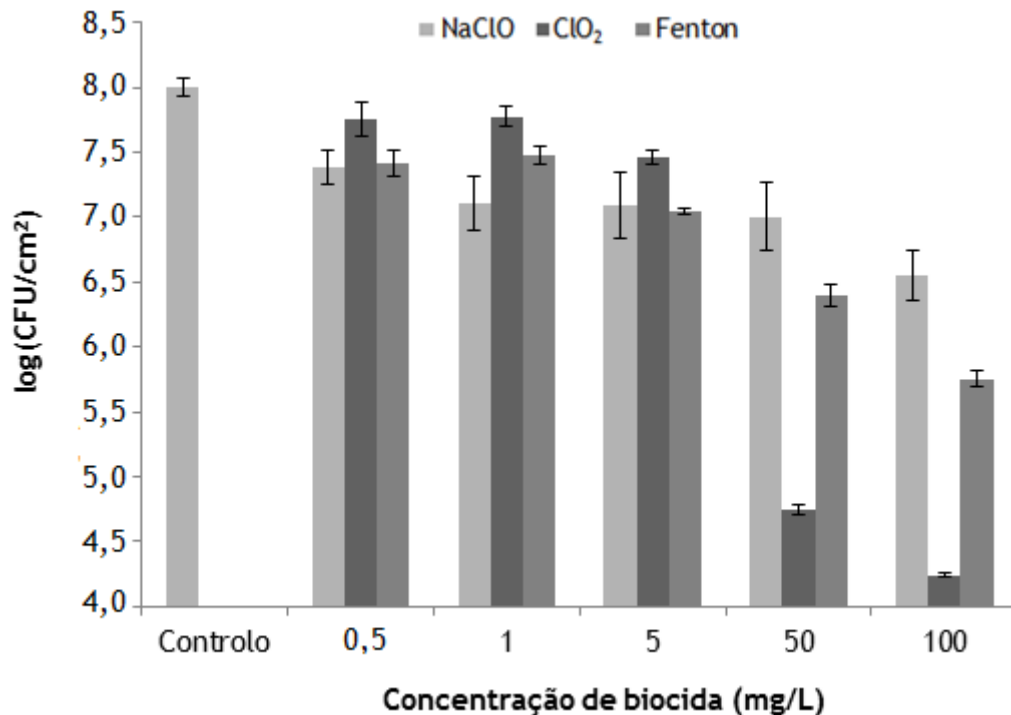


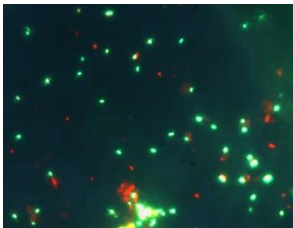
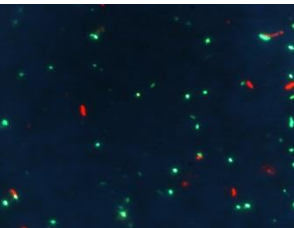
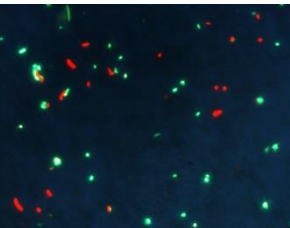
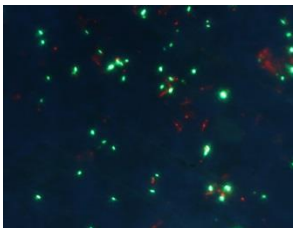
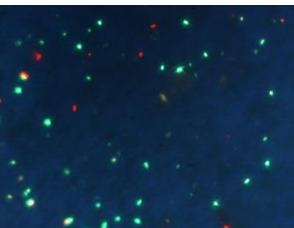
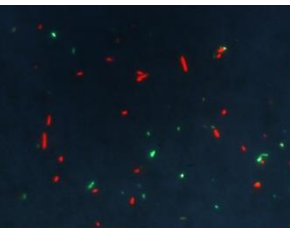
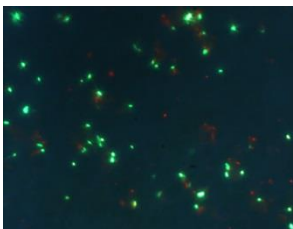
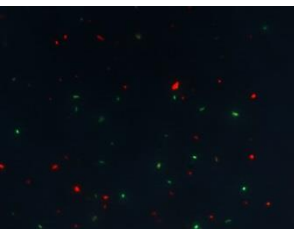
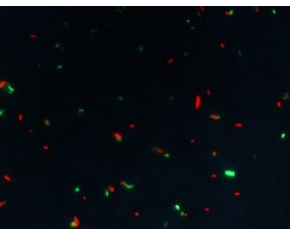
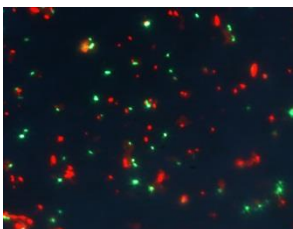
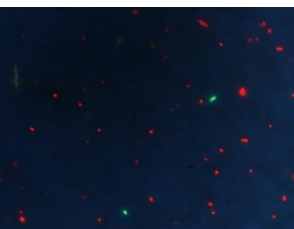
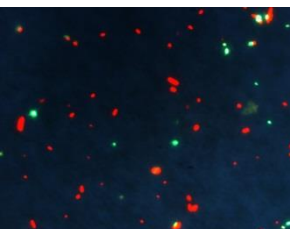
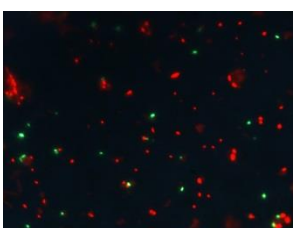
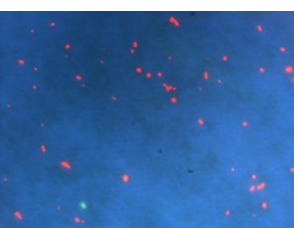
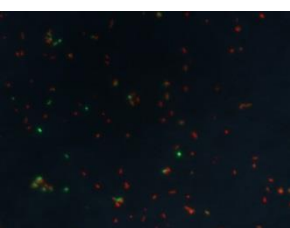
Figura 4.8 - Contagem das unidades formadoras de colónia (UFC) em função da concentração de biocida.

Pela análise da Figura 4.8 verifica-se claramente que o tratamento com  $\text{ClO}_2$  permite maior perda na culturabilidade das células dos biofilmes. O aumento da concentração deste biocida mostrou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na perda de culturabilidade. No entanto, este efeito não foi sempre observado, uma vez que entre 0,5 mg/L e 5 mg/L a diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ ).

O reagente de Fenton, por sua vez, mostrou ser significativamente mais eficiente ( $P < 0,05$ ) na perda da culturabilidade do que o NaOCl.

Na Tabela 4-2 são mostradas algumas das fotografias tiradas ao microscópio de epifluorescência.

Tabela 4-2 - Fotografias do microscópio de epifluorescência de células de biofilmes após tratamento com os biocidas NaOCl, ClO<sub>2</sub> e reagente de Fenton, a diferentes concentrações (Ampliação 1000x).

Concentração de agente antimicrobiano (ppm)	NaOCl	ClO <sub>2</sub>	Reagente de Fenton
0,5			
1			
5			
50			
100			

Através da análise das fotografias constata-se, como referido anteriormente, que o  $\text{ClO}_2$  foi o agente antimicrobiano mais eficaz pois reduziu significativamente o número de células viáveis.

## 5 Conclusões e perspetivas para trabalho futuro

### 5.1 Conclusões

A bactéria *P. fluorescens* mostrou uma boa capacidade de formação de biofilme em superfícies de PVC.

A utilização de diferentes métodos para avaliar a eficácia do biocida pode levar a conclusões diferentes quanto aos efeitos provocados pelo biocida. O reagente de Fenton mostrou-se mais eficaz que o NaOCl na perda de culturabilidade. No entanto, ambos os biocidas apresentaram resultados semelhantes na perda de viabilidade das células do biofilme.

O processo Fenton apresentou-se como promissor no controlo de biofilmes uma vez que apresentou resultados satisfatórios em comparação com o hipoclorito de sódio. Apesar do dióxido de cloro ter sido o oxidante que revelou um maior impacto no controlo de biofilmes de *P. fluorescens*, o processo Fenton pode ser uma alternativa viável para o controlo de biofilmes.

### 5.2 Trabalho Futuro

Os testes realizados neste trabalho não foram suficientes para avaliar se o reagente de Fenton é capaz de substituir completamente agentes biocidas tradicionais.

Neste trabalho não foi possível estudar as melhores condições da aplicação do processo Fenton. Um estudo deste género necessita de um número elevado de ensaios o que o tempo de realização do trabalho não o permitiu. A concentração de ferro foi portanto mantida constante no reagente de Fenton, e apenas foi variada a concentração de peróxido de hidrogénio. Assim, não foi estudada a influência que a concentração de ferro poderia ter no controlo de biofilmes.

Este processo é normalmente utilizado como pré-tratamento de águas residuais, com o objetivo de aumentar a sua biodegradabilidade, e a possibilidade de ser utilizado como pré-tratamento no controlo de biofilmes deveria ser testada. Ou seja, a sua utilização poderia potenciar a ação dos biocidas tradicionais.

Seria interessante perceber o tipo de reação que existe entre o biocida e as SPE, uma vez que este processo provoca o desprendimento do biofilme com muita facilidade. Este facto pode significar que este processo está mais apto e ser eficaz se utilizado como um pré-tratamento. Assim, ao libertar as células da superfície e ao desagregá-las, torná-las-ia menos resistentes ao tratamento posterior.

Outro aspeto importante a considerar é a realização de um estudo económico visto que, no final deste processo, pode haver a necessidade de remover o ferro da água. Este processo pode ser dispendioso e por isso comprometer a aplicabilidade industrial do mesmo.

Por fim, seria interessante aplicar este método em culturas mistas e verificar se o desempenho é alterado. O tipo de cultura microbiana afeta a produção de SPE (em qualidade e quantidade), podendo este facto influenciar a ação do reagente de Fenton.

## Bibliografia

- Andreozi, R.; Caprio, V. ; Insola, A. e Marotta, R.. “Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery.” *Catalysis Today*, 1999: 51-59.
- Andrews, Jennifer M. “Determination of minimum inhibitory concentrations.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (2001): 5-16.
- Araújo, Livia Vieira de; Freire, Denise Maria Guimarães e Nitschke, Márcia. “Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas.” *Química Nova* 36 (6) (2013): 848-858.
- Bailey e Ollis, D.F. In *Biochemical Engineering Fundamental.*, de, 2ª edição. McGraw-Hill, 1986.
- Bigda, R.J. “Consider Fenton’s Chemistry for Wastewater Treatment.” *Chemical Engineering Progress* 91 (12) (1995): 62-66.
- Carpentier, B. e Cerf, O. “Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in food industry.” *Journal of Applied Microbiology* 75: 499-511 (1993).
- Chen, X. e Stewart, P. S.. “Biofilm removal caused by chemical treatments.” *Water Research* 34 (2000): 4229-4233.
- Cochran, W. L.; McFeters, G. A. e Stewart, P. S.. “Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine.” *Journal of Applied Microbiology* 88 (2000): 22-30.
- Costerton, J. W. e Stewart, P. S.. “Battling biofilms.” *Scientific American* 285 (2001): 74-81.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S. e Greenberg, E. P.. “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.” *Science* 284 (Maio 1999): 1318-22.
- Cousin, M. A. “Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review.” *Journal of Food Protection* 45 (1982): 172-207.
- Deines, P.; Sekar, R.; Husband, P. S. ; Boxall, J. B.; Osborn, A. M. e Biggs, C. A.. “A new coupon design for simultaneous analysis of in situ microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2) (2010): 749-756.

- Denyer, S. P. e Stewart, G. S. A. B.. "Mechanisms of action of disinfectants." *International Biodeterioration and Biodegradation* 41 (1998): 261-268.
- Dias, Jorge. "Tratamento de Efluentes da Indústria Farmacêutica por processos avançados de oxidação." *Tese de Mestrado*. Novembro de 2011.
- Dongan, B. e Boor, K. J.. "Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003): 130-138.
- Donlan, R. M. e Costerton, J. W. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2002): 167-193.
- Ferreira, Carla; Rosmaninho, R.; Simões, Manuel; Pereira, M. C.; Bastos, M. M. M. M.; Nunes, O. C.; Coelho, M. e Melo, Luís "Biofouling control using microparticles carrying a biocide." *Biofouling* 26: 205-212 (2010).
- Flaherty, K. A. e Huang, C. P.. "Batch and Continuous Flow Applications of Fenton's Reagent and Fenton-Like Chemistry for the Treatment of Refractory Textile Wastewaters." In *Chemical oxidation technologies for the nineties* , 112-133. Technomic AG , Basel, CH, 1994.
- Flemming, H-C.; Schaule, G.; McDonog, R. e Ridgway, H.F.. "Effects and Extent of Biofilm Accumulation in Membrane systems." *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, 1994: 63-90.
- Gallard, H. e De Laat, J.. "Kinetics of oxidation of chlorobenzenes and phenyl-ureas by Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence of reduction and oxidation reactions of intermediates by Fe(II) or Fe(III)." *Chemosphere* 42(4) (2001): 405-413.
- Gibson, H. J.; Taylor, H. ; Hall, K. E. e Holah, J. T.. "Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms." *Journal of Applied Microbiology* 87 (1999): 41-48.
- Gilbert, Peter e Brown, M. R. W.. "Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents." In *Microbial Biofilms*, de H. M. Lappin-Scott e J. W. Costerton, 118-130. Cambridge University Press, 1995.
- Glaze, William; Joon-Wun Kang, e Douglas H. Chapin. "The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation." *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association* 9 (1987): 335-352.



- Goldstein, S.; Meyerstein, D. e Czapski, G.. “The Fenton reagents.” *Free Radical Biology and Medicine* 15(4) (1993): 435-45.
- Gosselin, F.; Madeira, L. M. ; Juhna, T. e Block, J. C.. “Drinking water and biofilm disinfection by Fenton-like reaction.” *Water Research* 47 (2013): 5631-5638.
- Hassen, A.; Heyouni, A. ; Shayeb, H. ; Cherif, M. e Boudabous, A.. “Inactivation of indicator bacteria in wastewater by chlorine - a kinetics study.” *Bioresource Technology* 72 (2000): 85-93.
- Higarashi, M. M.; Moreira, J.C. ; Oliveira, A. S. e Ferreira, L.F.V.. “A Utilização de Processos Oxidativos Avançados na Descontaminação do Meio Ambiente.” 2000.
- Holah, J. T. “Industrial monitoring: hygiene food processing.” In *Biofilms - Science and Technology*, de L. F. Melo, T. R. Bott e M. e Capdeville, B. Fletcher, 645-659. Kluwer Academic Publs, 1992.
- Howard, F. Jenkinson e Lappin-Scott Hilary, M.. “biofilms adhere to stay.” *Trends in Microbiology* 9 (1) (2001): 9-10.
- James, G. A.; Beaudette, L. e Costerton, J. W.. “Interspecies bacterial interactions in biofilms.” *Journal of Industrial Microbiology*, 1995: 15, 257-262.
- Kang, Y. W. e Hwang, K. Y.. “Effects of Reaction Conditions on the Oxidation Efficiency in the Fenton Process.” *Water Research* 34 (2000): 2786-2793.
- Kennedy, Beth. *Miox*. Março de 2011. <http://www.miox.com> (acedido em Janeiro de 2014).
- Kim, B. R.; Anderson, J. E. ; Mueller, S. A.; Kendall, W. A. e Gaines, A. M.. “Literature review - efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems.” *Water Research* 36 (2002): 4433-4444.
- Körstgens, V.; Flemming, H.-C. ; Wingender, J. e Borchard, W.. “Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms.” *Journal of Microbiology Methods* 46 (2001): 9-17.
- Lin, S. H. e Lo, C. C. “Fenton Process for Treatment of Desizing Wastewater.” *Water Research* 31 (1997): 2050-2056.
- Lu, M. C.; Roam, G. D. ; Chen, J. N. e Huang, C. P. “Photocatalytic oxidation of dichlorvos in the presence of hydrogen peroxide and ferrous ion.” *Water Research* 30 (1994): 29.

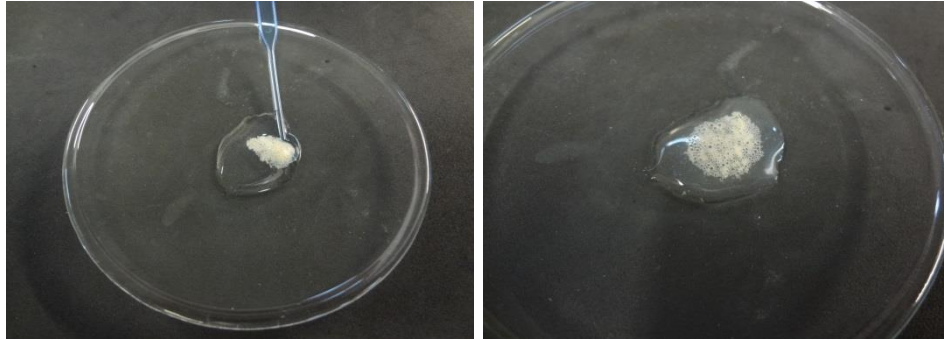
- Machado, Sílvia. “Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcónio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis.” *Tese de Mestrado*, 2005.
- Mah, T-F e O’Toole, G. A. “Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.” *TRENDS in Microbiology* 9 (2001): 34-39.
- McBain, A. J.; Ledder, R. G. ; Sreenivasan, P. e Gilbert, P.. “Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (5) (2004): 772-777.
- Mosteller, T. M. e J. R. Bishop. “Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm.” *J Food Prot* 56: 34-41 (1993).
- Neyens, E. e J. Baeyens. “A review of classic Fenton’s peroxidation as an advanced oxidation technique.” *Journal of Hazardous Materials*, 2003: 33-50.
- O’Toole, Thien-Fah C. Mah e George A. “Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agentes.” *TRENDS in Microbiology* 9 (2001).
- Salvato, Joseph A. ; Nemerow, Nelson L. e Agardy, Franklin J. “Treatment of water - design and operation control.” In *Environmental Engineering*, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- Sauer, K.; Camper, A. K.; Erchlich, G. D. ; Costerton, J. W. e Davies, D. G.. “Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm.” *Journal of Bacteriology* 184 (2002): 1140-1154.
- Sidhu, M. S., Holck, S. e Langsrud, A. “Desinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from food industry.” *Microbial Drug Resistance* 7 (2001): 73-83.
- Simões, M.; Carvalho, H.; Pereira, M. O. e Vieira, M. J. “Studies of the behaviour of Pseudomonas fluorescens biofilms after ortho-phthalaldehyde disinfection.” *Biofouling*, 2003: Vol. 19, pp. 151-157.
- Simões, Lúcia, e Simões, Manuel. “Biofilms in drinking water: problems and solutions.” *RSC Advances* 3 (2013): 2520-2533.
- Simões, M.; Pereira, M. O. e Vieira, M. J.. “Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals.” *Water Res.* 39 (2005a): 5142-5152.
- Simões, Manuel; Simões, Lúcia C. S e Vieira, Maria J.. “A review of current and emergent biofilm control strategies.” *Food Science and Technology* 43 (2010): 573-583.

- Smirnova, T. A., Didenko, L. V. ; Azizbekyan, R. R. e Yu. M. Romanova. "Structural and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms." *Microbiology* 79 (4) (2010): 413-423.
- "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater." American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2014.
- Stewart, Philip S., Martin A. Hamilton, Brian R. Goldstein, e Brian T. Schneider. "Modeling Biocide Action Against Biofilms." *Biotechnol. Bioeng.*, 1996: 49, 445-455.
- Swart, G. J., Jooste, P. J. e Mostert, J. F.. "Species identification and some physiological characteristics of Gram-negative psychrotrophic isolates from raw silo milk." *South African journal of dairy technology* 22 (1990): 31-36.
- Tachikawa, M., Tezuka, M.; Morita, V. ; Isogai, K. e Okada, S.. "Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system." *Water Research* 39 (2005): 4126-4132.
- Thorn, R. M., Robinson, G. M. e Reynolds, D. M.. "Comparative Antimicrobial Activities of Aerosolized Sodium Hypochlorite, Chlorine Dioxide, and Electrochemically Activated Solutions Evaluated Using a Novel Standardized Assay." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(5) (2013): 2216-2225.
- Van Houdt, R., e Michiels, C. W.. "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface." *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010): 1117-1131.
- Venkatadri, Rajagopalan, e Robert W. Peters. "Chemical Oxidation Technologies: Ultraviolet Light/Hydrogen Peroxide, Fenton's Reagent, and Titanium Dioxide-Assisted Photocatalysis." *Hazardous Waste and Hazardous Materials* 10 (2) (1993): 107-149.
- Venny, G. Suyin, e H.K. Ng. "Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils." *Chemical Engineering Journal* 213 (2012): 295-317.
- Vieira, M. J., Melo, L. e Pinheiro, M. M.. "Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure." *Biofouling* 7 (1993): 67-80.
- Walling, C. "Fenton's Reagent Revisited." *Accounts of Chemical Research* 8(4) (1975): 125-131.

- Wiedmann, M., Weilmeier, D. ; Dineen, S. S.; Malyea, R. e Boor, K. J.. “Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* sp. isolated from milk.” *Applied Environmental Microbiology* 66 (2000): 2085-2095.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I. M., e Mattila-Sandholm, T.. “Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50 (2001): 37-50.

## Anexos

### Anexo 1 Teste da catalase



*Figura A.1 - Teste da catalase à bactéria *Pseudomonas fluorescens*.*